

Quantitative Histochemie der Enzyme

(Eine Übersicht)

Von H. MATTENHEIMER¹⁾

Aus dem Tissue and Cell Biology Laboratory, Renal and Nutrition Section, Division of Medicine and Department of Biochemistry, Presbyterian-St. Luke's Hospital, Chicago, Illinois, USA

(Eingegangen am 30. März 1968)

Herrn Prof. Dr. Dr. Ernst Schütte zum 60. Geburtstag gewidmet

An Hand einer Übersicht wird die Entwicklung histochemischer Methoden zum quantitativen Enzymnachweis von den Anfängen vor etwa vierzig Jahren besprochen. Mit den Methoden können Enzymaktivitäten in Zellgruppen mit einem Gewicht von der Größenordnung 10^{-9} g bestimmt werden. Als Beispiel wird das quantitative Enzymverteilungsmuster im Nephron der Menschenniere angeführt.

This review describes the development of histochemical methods for the quantitative determination of enzymes, from its beginning approximately forty years ago. The methods permit to determine enzyme activities in groups of cells weighing in the order of 10^{-9} g. The quantitative enzyme pattern in the nephron of the human kidney serves as an example.

Vor nahezu vierzig Jahren begannen LINDERSTRØM-LANG und HOLTER am Carlsberg-Laboratorium in Kopenhagen mit ihren Arbeiten über die quantitative enzymatische Histochemie (1). Die Autoren setzten sich zum Ziel Methoden zu entwickeln, um spezifische Funktionen einzelner Zellen oder Zellgruppen quantitativ zu erfassen, die bei Enzymbestimmungen und Stoffwechseluntersuchungen an Organschnitten und -homogenaten im Durchschnitt der Stoffwechselleistungen einer heterogenen Zellpopulation nicht immer erkennbar sind. Viele der heute im biochemischen Laboratorium angewandten Mikro- und Ultramikromethoden entstammen Ideen aus der Carlsberggruppe, deren großes Verdienst es ist, nicht nur selbst an der Entwicklung und Anwendung spezieller Methoden zu arbeiten, sondern ein stets offenes Haus für Gäste aus aller Welt zu haben, die sie anregen und von denen sie Anregungen empfangen. Die vorliegende Übersicht soll in kurzen Zügen die Entwicklung der quantitativen enzymatischen Histochemie und an einigen Beispielen den jetzigen Stand dieses Zweiges der Biochemie aufzeigen.

Geräte

LINDERSTRØM-LANG und Mitarbeiter entwickelten den cartesianischen Taucher zur Mikromanometrie, mit dem Volumenänderungen in der Größenordnung von 10^{-3} μ l (2, 3, 4) gemessen werden können. Noch empfindlichere Taucher beschrieben ZEUTHEN zur Messung von 10^{-5} μ l (5) und BRZIN und ZEUTHEN zur Messung von 10^{-7} μ l (6). Mit diesem Taucher sollte es möglich sein, einzelne Säugetierzellen zum Versuch einzusetzen. LØVLIE und ZEUTHEN (7) beschrieben einen Gradienten-Taucher mit Registriereinrichtung. Nach dem Prinzip des cartesianischen Tauchers ar-

beitet auch die von ZEUTHEN entwickelte Taucher-Waage (8, 9, 10), mit der das reduzierte Gewicht lebender Zellen in einem geeigneten Kulturmedium bestimmt werden kann.

LOWRY (11) führte die Quarzfadenwaage ein. Die erste beschriebene Waage hatte eine Empfindlichkeit von etwa 30 ng. Später berichtete LOWRY über die Herstellung wesentlich empfindlicherer (bis zur Größenordnung von 1 pg) Quarzfadenwaagen (12, 33, 34). Für die Kolorimetrie in Volumina von 5–10 μ l wurde zunächst ein Mikroskop-Photometer verwendet (13, 14, 15). LOWRY und BESSEY beschrieben dann eine spaltförmige Mikroküvette zum Beckman Spektralphotometer, in der Volumina zwischen 50 und 300 μ l gemessen werden können (16). Dieser Küvettentyp mit 10 mm Lichtweg ist heute für viele der handelsüblichen Spektral- und Filterphotometer erhältlich (27). Ein Einsatz zu diesen Küvetten ermöglicht Reduktion des Meßvolumens auf 5 μ l (17). Eine Spezialküvette zu Bestimmungen in 1 μ l wurde von ULLRICH entwickelt (18). Schließlich sei noch auf die 20 μ l fassende Küvette MR 1 D von Zeiss, Oberkochen, hingewiesen.

Eine vielseitig anwendbare Mikrotitrationseinrichtung wurde von LINDERSTRØM-LANG und HOLTER eingeführt (1) und z. B. bei der Bestimmung der Verteilung des Pepsins (19), der Salzsäure (20), einer Peptidase (21) und einer Esterase (22) in der Magenschleimhaut verwendet. Als Inkubations- und Titrationsgefäße dienen Teströhrchen etwa 30×4 mm, zur Titration geeichte Kapillarbüretten. Zum Mischen werden kleine magnetische Rührer aus Glas mit einem Kern aus Eisenstaub (sogenannte „Flöhe“) verwendet. Ein ähnliches Verfahren eignet sich auch zur Bestimmung Ammoniak abspaltender Enzyme (23).

Die verschiedenen Typen von Mikroliter-Pipetten sind bei GLICK (24) beschrieben. Nach meiner Erfahrung ist der von LEVY entwickelten Konstriktionspipette (25) der Vorzug zu geben. Konstriktionspipetten lassen

¹⁾ Die Arbeiten im Laboratorium des Verfassers werden durch folgende Grants unterstützt: United States Public Health Service HE-03912, 5-K3-GM 15524, Kontrakt DA-49-193-MD-2625, U. S. Army Medical Research and Development Command.

sich auch leicht aus Polyäthylen herstellen (26, 27) und zeichnen sich wegen der Unbenetzbarkeit durch besonders große Genauigkeit aus. Die Besprechung wurde hier auf einige wesentliche Geräte zur Mikroanalyse beschränkt. Viele nützliche Hinweise auf Apparaturen finden sich in der Literatur (24, 27, 28).

Gewinnung und Aufarbeitung des Gewebes

Von kleinen Versuchstieren werden die Organe nach Dekapitation und Ausbluten, möglichst ohne Narkose, bei großen Laboratoriumstieren in Narkose entnommen. Gewebeproben vom Menschen werden durch chirurgische Biopsie oder perkutane Nadelbiopsie (Leber und Niere) gewonnen. Die Aufarbeitung richtet sich nach der Fragestellung. Zu Untersuchungen in Homogenaten kann frisches Nierengewebe z. B. ohne Schwierigkeiten unter einem Präparationsmikroskop bei 20facher Vergrößerung in Cortex, äußere Zone der Medulla, innere Zone der Medulla und Papille zerlegt werden. Die Gewebeproben werden dann homogenisiert und eventuell zur getrennten Gewinnung der Enzyme aus dem cytoplasmatischen und mitochondrialen Raum fraktioniert extrahiert (27, 29). Zur Enzymanalyse dienen Mikromodifikationen der bekannten Bestimmungsmethoden (27, 30). Soll die Enzymaktivität auf das Frischgewicht bezogen werden, so ist zu beachten, daß kleine Gewebestücke sehr rasch durch Wasserverdunstung an Gewicht verlieren. Das ist besonders bei Nadelbiopsien von geringem Durchmesser mit relativ großer Oberfläche zu berücksichtigen. Es ist ratsam, den Gewebezylinder sofort nach der Gewinnung zu wiegen, den Gewichtsabfall über einige Minuten zu verfolgen und durch graphische Extrapolation auf die Zeit Null das tatsächliche Frischgewicht festzustellen. Hierzu ist die Cahn-Elektrowaage (31) sehr geeignet, die leicht transportiert und in den Operationsraum mitgenommen werden kann. Mit der gleichen Waage kann auch das Trockengewicht von Homogenaten in Volumina zwischen 10 und 50 μ l, je nach Konzentration, bequem bestimmt werden.

Zur Mikrodissektion von einzelnen Zellen oder von Zellgruppen wird das Gewebe direkt nach der Entnahme in flüssigem Stickstoff gefroren. Um rasches Durchfrieren zu gewährleisten und damit Eiskristallbildung zu vermeiden, die zu einer Zerstörung der Zellstrukturen führen kann, müssen die Gewebestücke entsprechend klein sein. In einem Kryostaten werden dann bei -20° 15–20 μ dicke Schnitte hergestellt. Aus jeder Serie von drei Schnitten wird Schnitt 2 zur Kontrolle und Orientierung nach einer geeigneten histologischen Methode gefärbt. Kontrolle der Enzymanalyse in Gewebeschnitten mit gefärbten Schnitten wurde zuerst von LINDERSTRÖM-LANG und MOGENSEN beschrieben (32). Schnitte 1 und 3 von jeder Serie werden gefriergetrocknet und bei -35° aufgehoben. Hierfür wurden von LOWRY (33) geeignete Halter und Vorratsgefäße entwickelt. Die Dissektion erfolgt in einem temperatur- und feuchtigkeitskonstanten Raum (18–25°, 20–30% relative Luftfeuchtigkeit). LOWRY

untersuchte den Einfluß der Luftfeuchtigkeit auf das Gewicht gefriergetrockneter Gehirnschnitte. Bei relativer Feuchtigkeit von 30–65% lag das Gewicht 4–9% höher als das Gewicht im Vakuum (34). Die gefriergetrockneten Gewebeschnitte können wiederholt auf Zimmertemperatur gebracht und wieder bei -35° aufgehoben werden, ohne daß für die meisten der bisher untersuchten Enzyme ein Aktivitätsverlust eintritt.

Die Präparation der Zellen erfolgt mit freier Hand unter einem Präparationsmikroskop bei 20–80facher Vergrößerung. Zur Orientierung und Differenzierung einzelner Strukturen dient der gefärbte angrenzende Schnitt. Als Messerchen eignen sich Splitter von Rasierklingschneiden, die z. B. in einer Klemmpinzette gehalten werden. Das Instrumentarium zur Mikrodissektion ist in allen Einzelheiten beschrieben (12, 24, 33–35).

Präparierte Partikel werden dann mit einer Quarzfadenwaage gewogen (s. oben). Es ist ratsam, mehrere Waagen mit verschiedener Empfindlichkeit und Belastungskapazität herzustellen. Für sehr aktive Enzyme benötigt man weniger Zellen als für weniger aktive. Für die Arbeiten am Nephron benötigen wir Waagen mit Kapazitäten bis zu etwa 50, 200 und 400 ng.

Ultramikrochemische Methoden zur Enzymbestimmung

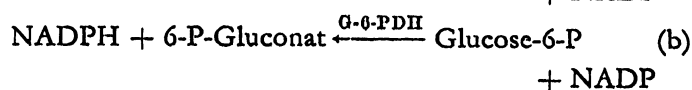
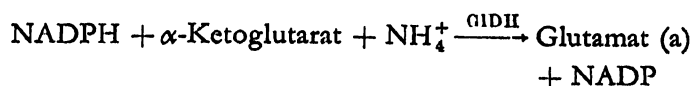
Zur Bestimmung von Dehydrogenasen und Enzymreaktionen, die mit einem Dehydrogenasesystem gekoppelt werden können, wird von der starken Fluoreszenz von NAD^+ und NADP^+ nach Behandlung mit 6N Natronlauge Gebrauch gemacht (36, 37). In einer Dehydrogenasereaktion, bei der NADH zu NAD oxydiert wird, muß zunächst der Überschuß an reduzierter Form am Ende der Inkubation durch 0,2N HCl zerstört werden. Bei einer umgekehrt verlaufenden Reaktion $\text{NAD} \rightarrow \text{NADH}$ wird überschüssiges NAD mit 0,02N Natronlauge zerstört, gefolgt von chemischer Oxydation des NADH zu NAD mit H_2O_2 .

Für die gebräuchlichen Enzymbestimmungsmethoden liegen die Inkubationsvolumina zwischen 1 und 10 μ l. Das Endvolumen zur Fluorometrie ist meist 1 ml, kann aber auf 100 μ l reduziert werden, wenn die Meßeinrichtung im Fluorometer entsprechend adaptiert werden kann. Die Empfindlichkeit der Messung wird somit nochmals um den Faktor 10 gesteigert.

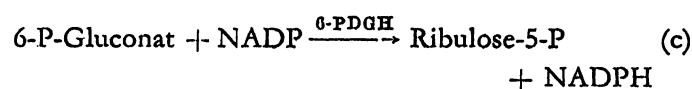
Ein sehr interessantes Verfahren, um kleinste Mengen von Nikotinamidnucleotiden messen zu können, wurde von LOWRY und Mitarbeitern entwickelt und als „enzymatic cycling“ bezeichnet (38). Im Fall der Bestimmung von NADPH wird nach Zerstörung des überschüssigen NADP die Lösung einem Ansatz zugegeben, der NH_4^+ , α -Ketoglutarat, GIDH^1), Glucose-

¹⁾ Verwendete Abkürzungen: AP = alkalische Phosphatase (EC 3.1.3.1); CAH = Kohlensäure-anhydrase (EC 4.2.1.1); GOT = Aspartat-aminotransferase (Glutamat-oxalacetattransaminase) (EC 2.6.1.1); GPT = Alanin-aminotransferase (Glutamat-pyruvattransaminase) (EC 2.6.1.2); GIDH = Glutamat-dehydrogenase (EC

6-Phosphat und G-6-PDH enthält. NADPH reagiert in der GIDH-Reaktion unter Bildung von NADP (a), das in der G-6-PDH-Reaktion wieder reduziert wird (b) und erneut in Reaktion (a) eintritt.



Wenn genügend von beiden Enzymen zugesetzt wird kann der Zyklus in 30 Min. 10000mal durchlaufen werden, d. h. für jedes Molekül NADPH entstehen 10000 Moleküle 6-P-Gluconat, das nach Zerstörung der zugesetzten Enzyme durch Hitze unter Zusatz von neuem NADP im Überschuß und 6-PGDH gemessen wird (c).



Für jedes ursprüngliche Molekül NADPH sind nun 10000 Moleküle gebildet worden. Reicht die Empfindlichkeit immer noch nicht aus, kann der Überschuß an zugesetztem NADP in Reaktion (c) durch Alkali zerstört und NADPH erneut in den Zyklus eingesetzt werden und eine nochmalige Verstärkung der Empfindlichkeit erreicht werden. Die Autoren geben an, daß der Fehler der NADPH-Bestimmung mit dieser Methode selbst beim zweifachen „Cycling“ nur etwa 3% beträgt.

Enzymreaktionen, die sich nicht mit einer Dehydrogenase koppeln lassen, werden kolorimetrisch oder titrimetrisch bestimmt. Um die Empfindlichkeit der Kolorimetrie so zu steigern, daß man die Enzyme in ng-Mengen Gewebe messen kann, werden die Endvolumina so klein wie möglich gehalten. Zur Bestimmung der alkalischen Phosphatase z. B. mit p-Nitrophenylphosphat (39) in präparierten Zellen des Nephrons, haben BONTING und Mitarbeiter (40) die Inkubation in 3 µl Substratreagenz vorgenommen und nach Zugabe von 50 µl 0,1N NaOH in LOWRY-BESSEY-Küvetten gemessen. Die Empfindlichkeit läßt sich noch steigern, indem man das Meßvolumen noch verringert und in Küvetten mit kleinerem Mindestvolumen (s. oben) mißt.

Wir sind in meinem Laboratorium gegenwärtig dabei, derartige Methoden zur Bestimmung der Arylaminopeptidase mit Leucin-p-nitroanilid und der γ-Glutamyltranspeptidase mit γ-Glutamyl-p-nitroanilid im Nephron zu entwickeln.

Zur Bestimmung der Kohlensäure-anhydrase in einzelnen Nervenzellen bediente sich GIACOBINI (41, 42)

1.4.1.2); G-6-PDH = Glucose-6-phosphat-dehydrogenase (EC 1.1.1.49); 6-PGDH = Phospho-gluconat-dehydrogenase (EC 1.1.1.44); ICDH = Isocitrat-dehydrogenase (EC 1.1.1.42); LDH = Lactatdehydrogenase (EC 1.1.1.27); MDH = Malat-dehydrogenase (EC 1.1.1.37).

des cartesianischen Tauchers. Wir übertrugen die Indikatormethode von ROUGHON und BOOTH (43) in den Ultramikromaßstab (27, 44). Die so modifizierte Methode hat zwar, bedingt durch den Ablesungsfehler bei der Beobachtung des Farbumschlages durchs Auge, einen Variationskoeffizienten von $\pm 10\%$, doch läßt sich in einer Versuchsreihe die CAH-Aktivität in 30–40 Gewebepartikeln bestimmen, was mit dem cartesianischen Taucher aus Zeitgründen nicht möglich ist.

Die Messung der Aktivität von NH_3 abspaltenden Enzymen kann nach dem Verfahren von LINDERSTRÖM-LANG und HOLTER (23, 45) erfolgen. Inkubation, Diffusion des NH_3 und Titration werden in einunddemselben Mikroteströhrchen (30×4 mm) durchgeführt. Das Inkubationsvolumen beträgt 15–25 µl. Am Ende der Inkubation wird Alkali zugegeben. Die Röhrchen werden mit einem Säure enthaltenden Tropfen (~ 40 µl) verschlossen. Nachdem NH_3 in die Säure diffundiert ist, wird in dem Tropfen titriert. Mit dieser Methode bestimmten wir die Aktivität der Phosphoamidase in Amöben (46) und Glutaminasen in der Niere (47). Zur Titration verwenden wir den Beckman-Spinco 153 Mikrotitrator mit einer Ablesegenauigkeit von 0,01 µl. Bei Verwendung einer 0,02N H_2SO_4 zur Titration liegt die unterste Grenze der Erfassbarkeit von NH_3 in der Größenordnung 10^{-9} Mol im Ansatz.

Obwohl das Trockengewicht bei Enzymbestimmungen in ng-Mengen von Gewebe eine relativ einfach zu messende Bezugsgröße ist, wird manchmal der Bezug auf Protein notwendig sein. Ultramikromethoden zur Proteinbestimmung wurden von LOWRY und Mitarbeitern (48) mit dem Folin-Phenolreagenz und von NAYYAR und GLICK (49) durch Proteinfällung mit Bromsulfalein und kolorimetrischer Bestimmung des im Überstand verbleibenden Farbstoffes angegeben. Der Nachteil beider Methoden ist, daß die Farbreaktion bzw. die Fällung mit der Natur des Proteins variiert. Für jedes Gewebe (Proteingemisch) ist es daher erforderlich, Eichungen, bezogen auf Stickstoff (Kjeldahl), vorzunehmen. Wo das nicht möglich ist, liefern die Methoden immerhin brauchbare relative Bezugsgrößen. Eine Mikro-N-Bestimmung wurde entwickelt (45) und inzwischen vereinfacht, indem Veraschung, NH_3 -Diffusion und Titration in einem Mikroteströhrchen vorgenommen werden (H. HOLTER, persönliche Mitteilung). Schließlich sei noch auf die Desoxyribonucleinsäure als Bezugsgröße hingewiesen, die nach KISSANE und ROBINS fluorometrisch erfolgen kann (50).

Bevor über einige Ergebnisse mit den ultramikrochemischen Methoden berichtet wird, muß etwas über die Genauigkeit der Methoden gesagt werden. Nach unseren eigenen Erfahrungen bei der Enzymbestimmung in Zellgruppen des Nephrons (35) beträgt der Variationskoeffizient (Standardabweichung in % des Mittelwertes) beim Wiegen mit Quarzfadenwaagen nicht viel mehr als $\pm 1\%$. Die Variationskoeffizienten

beim Pipettieren mit Konstriktionspipetten aus Polyäthylen betragen ungefähr $\pm 0,2\%$ für Pipetten $> 100\mu\text{l}$, und höchstens 1% für Pipetten $< 10\mu\text{l}$. Die fluorometrische Enzymbestimmung (Dehydrogenasen, Aminotransferasen) hat Variationskoeffizienten bis zu $\pm 3\%$. Am schwierigsten ist die Genauigkeit der Mikrodisektion zu beurteilen. Wir haben aber einen Anhalt, daß bei der Präparation von Zellen z. B. der distalen Konvolute, im Höchstfall 10% des Gewichtes auf miterfaßtes, umliegendes Gewebe entfallen; bei proximalen Konvoluten und Glomeruli ist der Anteil geringer. Rechnet man, daß sich die Fehler von Wägung, Pipettieren und Analyse addieren, so ist der Variationskoeffizient etwa $\pm 5\%$. Fügt man den nicht genau bestimmbaren Fehler durch ungenaue Mikrodisektion hinzu, so darf man annehmen, daß der Variationskoeffizient für die Gesamtmethode zwischen 10 und 20% liegt. Es ist wichtig, über die Genauigkeit Rechenschaft abzulegen, um biologische Variation, z. B. von Nephron zu Nephron oder von Spezies zu Spezies, erkennen zu können.

DUBACH kam bei der Beurteilung der ultramikrochemischen Methoden zu den gleichen Ergebnissen (51). Seine Arbeit ist in vielen Abschnitten der unseren (35) sehr ähnlich.

Quantitative Enzymmuster im Nephron

Die Anwendung quantitativer histochemischer Methoden sei mit Ergebnissen von Untersuchungen am Nephron der gesunden Menschenniere demonstriert. BONTING und Mitarbeiter (52, 53) arbeiteten eine Mikrodisektionstechnik aus, mit der die verschiedenen funktionellen und anatomischen Einheiten des Nephrons aus 16μ dicken Nierenschnitten präpariert und mit den oben erwähnten ultramikrochemischen Methoden analysiert werden können. Es gelingt mit Sicherheit, Glomeruli, proximale und distale Konvolute und corticale Sammelröhrchen frei von umgebenden Strukturen zu erhalten. Die Erkennung und sichere Identifizierung von Strukturen in der Medulla und Papille im gefriergetrockneten Schnitt macht noch Schwierigkeiten, die Dissektion von Sammelröhrchen gelingt nur gelegentlich. Man beschränkt sich daher in der äußeren Zone der Medulla (gestreckte Tubuli, HENLEsche Schleifen, Sammelröhrchen), der inneren Zone der Medulla (HENLEsche Schleifen und Sammelröhrchen) und in der Papille (hauptsächlich Sammelröhrchen) auf die Präparation von Gewebequerschnitten, und die Enzymaktivität drückt einen Mittelwert für die vorhandenen Strukturen aus.

BONTING und Mitarbeiter untersuchten zunächst die Verteilung von LDH und verschiedenen Phosphatasen (53–58), und wir dehnten die Versuche später auf MDH, GIDH, GOT, GPT, CAH, Glutaminasen und LDH-Isoenzyme aus (59–64). DUBACH erhielt ähnliche Ergebnisse für einige dieser Enzyme und bestimmte außerdem ICDH und G-6-PDH (65, 66). Die Ergebnisse sind in Abbildung 1 zusammengestellt

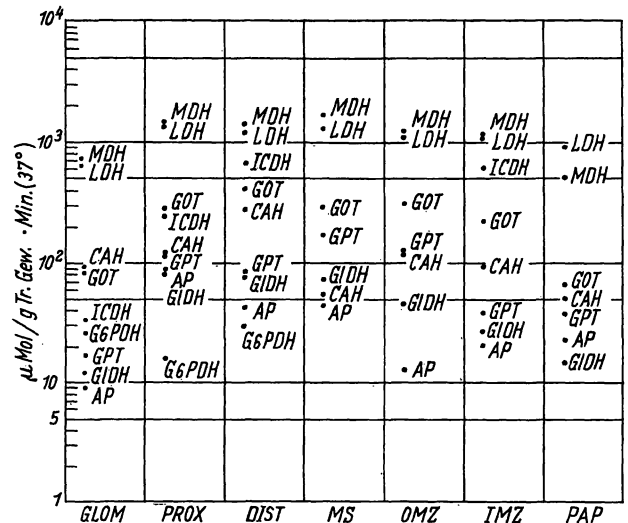


Abb. 1

Quantitative Enzymverteilungsmuster im Nephron der Menschenniere. Aktivität ausgedrückt in μMol Substrat/umgesetzt pro g Trockengewicht pro Min. bei 37° , mit Ausnahme der CAH, die in mMol gemessen bei 0° angegeben ist; Ordinate in logarithmischem Maßstab. GLOM = Glomerulus, PROX = proximale Konvolute, DIST = distale Konvolute, MS = Markstrahlen, OMZ = äußere Markschicht, IMZ = innere Markschicht, PAP = Papille

mit Ausnahme der Glutaminasen, die bei der Gefrier-trocknung des Gewebes inaktiviert werden und in frischen Homogenaten gemessen werden müssen. Hierzu haben wir durch chirurgische Biopsie oder perkutane Nadelbiopsie gewonnenes Nierengewebe in Cortex, äußere Medulla, innere Medulla und Papille zerlegt (60, 61, 64), um wenigstens die zonale Verteilung in der Niere messen zu können. Die Glutaminasen können nicht in Autopsiematerial gemessen werden, da sie nach dem Tode rasch zerstört oder inaktiviert werden. Im Gegensatz hierzu haben alle anderen von uns untersuchten Enzyme die gleiche Aktivität in Autopsie- und Biopsiematerial.

Die quantitativen Enzymverteilungsmuster im Nephron lassen sich in mehrfacher Hinsicht auswerten. Beim Studium der Rückresorptions- und Exkretionsvorgänge im Nephron ergänzen sie die Befunde der Mikropunktion des Nephrons. Als Beispiel sei hier die Kohlensäureanhydrase (CAH) gewählt, welche die Einstellung des Gleichgewichts der Reaktion



beschleunigt. In Abwesenheit des Enzyms ist Schritt 1 langsam, Schritt 2 ist rasch und von der CAH unbeflußt. Wasserstoffionen müssen ins Nephron sezerniert werden zur Ausscheidung von Säuren (titrierbare Acidität des Urins), zur Rückresorption von glomerulär gefiltertem Bikarbonat und zur Bildung von NH_4^+ aus NH_3 . Letzteres diffundiert leicht durch die Zellmembranen, das Ion hingegen kann nicht zurückdiffundieren und wird im Urin ausgeschieden.

Gefiltertes Bikarbonat wird in den proximalen Konvoluten rückresorbiert. In der Tubuluszelle wird CO_2 durch CAH zu Kohlensäure hydratisiert, und die Wasserstoffionen werden in das Tubuluslumen abgegeben, wo sie mit Bikarbonat zu Kohlensäure reagieren.

Diese wird nun wieder in CO_2 und H_2O gespalten und CO_2 wird resorbiert. Nach Untersuchungen von RECTOR und Mitarbeitern (67) durch Mikropunktion an proximalen und distalen Konvoluten der Rattenniere ist es wahrscheinlich, daß neben einer intrazellulären CAH in den proximalen und distalen Konvoluten noch eine CAH in der dem Lumen zugekehrten Zellmembran der proximalen Konvolute vorkommt. Ausgestattet mit einem Bürstensaum ist die innere Oberfläche in dieser Struktur sehr groß, und man kann annehmen, daß die Membran-CAH die Dehydratation der Kohlensäure im Urin katalysiert (Abb. 2). GOTTSCALK und Mitarbeiter (68) fanden, ebenfalls durch

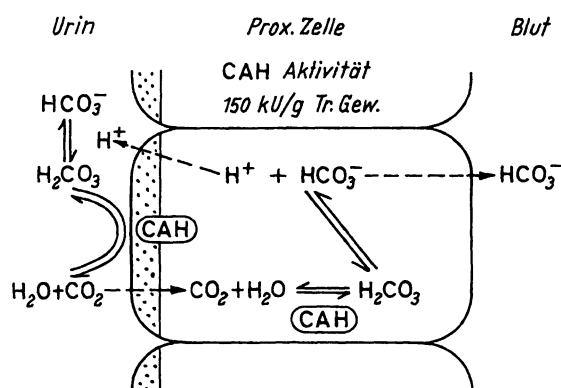


Abb. 2

Lokalisation und Funktion der Kohlensäure-anhydrase (CAH) in Zellen der proximalen Konvolute des Nephrons. Erklärungen im Text

Mikropunktion an der Rattenniere, daß die Ansäuerung des Urins im wesentlichen in den distalen Konvoluten und in den Sammelröhrchen erfolgt. Unsere Daten über die quantitative Verteilung der CAH in der Menschenniere, mit der höchsten Aktivität in den proximalen und distalen Konvoluten, machen es sehr wahrscheinlich, daß der Ort der Rückresorption von Bikarbonat, die Bildung von NH_4^+ und die Ansäuerung des Urins dem in der Rattenniere gefundenen entspricht. Damit stimmen auch die Ergebnisse an der Hundenniere überein (79, 80).

Die Glutaminasebestimmung in perkutanen Nadelbiopsien von der Menschenniere setzen wir ein, um die Aktivität bei Patienten mit Gicht zu bestimmen (69). Von GUTMAN und YÜ war postuliert worden, daß bei Gicht möglicherweise eine Insuffizienz der Glutaminasen besteht (70). Wir fanden jedoch im Normalbereich liegende Aktivitäten. Das schließt eine Hemmung der Enzyme *in vivo* nicht aus; mangelnde oder fehlende Synthese der Enzyme liegt jedenfalls nicht vor.

Bei der renalen tubulären Acidose, die eine Insuffizienz der CAH vermuten läßt, fanden wir bei verschiedenen Formen dieser Krankheit, einschließlich Fanconi-Syndrom, normale Aktivitäten in den verschiedenen Zellgruppen des Nephrons (unveröffentlicht).

In zunehmendem Umfang werden Enzymbestimmungen im Urin zur Diagnose bei Nierenerkrankungen herangezogen. Der Aussagewert steht aber noch auf sehr

unsicherem Boden (61, 71, 72). Die Kenntnis der quantitativen Enzymmuster im Nephron ist bei der Deutung und Beurteilung der Herkunft der Enzyme im Urin von großem Wert. Es ließ sich zum Beispiel mit Isoenzymmustern der LDH zeigen, daß die LDH im Urin beim Nierengesunden zum überwiegenden Teil aus den Rindenanteilen des Nephrons stammt (61, 72).

Für die Verteilung einiger Enzyme im Nephron bestehen Speziesunterschiede. Vergleichende Untersuchungen wurden von BONTING und Mitarbeitern vorgenommen (53, 54). Zur Untersuchung an der Rattenniere siehe (61, 73–77) und an der Hundenniere siehe (61, 78–80). Die Aktivitätsveränderungen bei Nierenkrankheiten, die in mehreren der Arbeiten beschrieben worden sind, bleiben in ihrer Deutung bezüglich der Pathophysiologie noch recht problematisch.

Die quantitative Histochemie der Enzyme wurde in dieser Übersicht am Beispiel des Nephrons demonstriert. Die Methoden — Mikrodissektion am gefriergetrockneten Gewebeschnitt, Wiegen mit der Quarzfadenwaage und ultramikrochemische Aktivitätsbestimmung — werden wegen der maßgebenden Entwicklungsarbeit von LOWRY häufig als „LOWRY-Methoden“ bezeichnet. LOWRY und Mitarbeiter haben hauptsächlich an der Retina und an Gehirn- und Nervengewebe gearbeitet. Zusätzlich zu den bereits erwähnten Arbeiten seien hier noch einige Veröffentlichungen genannt (81–85), in denen weitere Zitate aus diesem Arbeitskreis zu finden sind.

Untersuchungen zur Enzymverteilung im Leberläppchen wurden von SHANK und Mitarbeitern (86, 87), im Carotiskörperchen von LEE und Mitarbeitern (88), in der Mundschleimhaut von GERSON und Mitarbeitern (89) und in der Haut von HERSHEY und Mitarbeitern (96) mitgeteilt.

BONTING und Mitarbeiter haben sich ausführlich mit der Na-K-aktivierten ATP-ase in Beziehung zum Kationentransport in verschiedenen Organen beschäftigt (90–95) und die Zusammenhänge zwischen der Aktivität des Enzyms mit der Bildung von Liquor cerebrospinalis und Augenkammerwasser studiert. Wir haben versucht, die von BONTING angegebene Methode zur Bestimmung der Na-K-aktivierten ATP-ase, bei der das Phosphat aus der Reaktion $\text{ATP} \rightarrow \text{ADP} + \text{P}$ bestimmt wird, für Untersuchungen am Nephron anzuwenden. Dabei stellten wir fest (DEMIDOW und MATTENHEIMER, unveröffentlicht), daß neben ADP auch AMP gebildet, AMP dephosphoryliert und schließlich auch ATP resynthetisiert wird. Die gleichen Beobachtungen machten wir an Erythrocytenmembranen. ATP, ADP und AMP wurden enzymatisch bestimmt. Mit der Methode von BONTING können wir daher, wenigstens in der Niere und am Erythrocyten, keine Ergebnisse erhalten, die nur die Spaltung von ATP zu ADP erfassen.

Die vorliegende Übersicht beschäftigt sich mit der Histochemie der Enzyme und läßt cytochemische

Arbeiten, bis auf wenige Ausnahmen, unberücksichtigt. Die Cytochemie ist das Hauptarbeitsgebiet von HOLTER im Carlsberg-Laboratorium, und der interessierte Leser findet die Arbeiten in den *Comptes Rendus des Travaux*

du Laboratoire Carlsberg. Die letzte zusammenfassende Arbeit erschien 1951 (97). Nach dem Tode von KAJ LINDERSTRØM-LANG wurden ausgewählte Arbeiten in einem Band publiziert (98).

Literatur

1. LINDERSTRØM-LANG, K. und H. HOLTER, Hoppe-Seyler's Z. physiol. Chem. 201, 9 (1931). — 2. LINDERSTRØM-LANG, K. und D. GLICK, C. R. Trav. Lab. Carlsberg, Sér. chim. 22, 300 (1938). — 3. LINDERSTRØM-LANG, K., C. R. Trav. Lab. Carlsberg, Sér. chim. 24, 333 (1943). — 4. HOLTER, H., C. R. Trav. Lab. Carlsberg, Sér. chim. 24, 399 (1943). — 5. ZEUTHEN, E., C. R. Trav. Lab. Carlsberg, Sér. chim. 24, 479 (1943). — 6. BRZIN, M. und E. ZEUTHEN, C. R. Trav. Lab. Carlsberg, 34, 427 (1964/65). — 7. LØVLIE, A. und E. ZEUTHEN, C. R. Trav. Lab. Carlsberg, 32, 513 (1962). — 8. ZEUTHEN, E., C. R. Trav. Lab. Carlsberg, Sér. chim. 26, 243 (1948). — 9. LØVTRUP, S., C. R. Trav. Lab. Carlsberg Sér. chim. 27, 125 (1950). — 10. HAGENS, H. W., Histochemie 1, 109 (1958). — 11. LOWRY, O. H., J. biol. Chemistry 140, 183 (1941). — 12. LOWRY, O. H., Harvey Lect. 58, 1 (1962/63). — 13. NORBERG, B., Acta physiol. Scand. 5, Suppl. 14 (1942). — 14. HOLTER, H. und S. LØVTRUP, C. R. Trav. Lab. Carlsberg Sér. chim. 27, 27 (1949). — 15. GLICK, D., Chem. Engng. News 31, 139 (1953). — 16. LOWRY, O. H. und O. A. BESSEY, J. biol. Chem. 163, 633 (1946). — 17. GLICK, D. und B. W. GRUNBAUM, Analytic. Chem. 29, 1243 (1957). — 18. ULLRICH, K. J., Biochem. Pharmacol. 9, 181 (1962). — 19. HOLTER, H. und K. LINDERSTRØM-LANG, Hoppe-Seyler's Z. physiol. Chem. 226, 149 (1934). — 20. LINDERSTRØM-LANG, K. und H. HOLTER, Hoppe-Seyler's Z. physiol. Chem. 226, 173 (1934). — 21. LINDERSTRØM-LANG, K. und H. HOLTER, Hoppe-Seyler's Z. physiol. Chem. 226, 177 (1934). — 22. GLICK, D., Hoppe-Seyler's Z. physiol. Chem. 226, 186 (1934). — 23. LINDERSTRØM-LANG, K. und H. HOLTER, Hoppe-Seyler's Z. physiol. Chem. 220, 5 (1933). — 24. GLICK, D., Quantitative Chemical Techniques of Histo- and Cytochemistry. Vol. I. and II., Interscience Publishers, John Wiley and Sons, New York und London (1961). — 25. LEVY, M., C. R. Trav. Lab. Carlsberg Sér. chim. 21, 101 (1936) und Hoppe-Seyler's Z. physiol. Chem. 240, 33 (1936). — 26. MATTENHEIMER, H., J. Laborat. clin. Med. S. Louis 58, 783 (1961). — 27. MATTENHEIMER, H., Mikromethoden für das klinisch-chemische und biochemische Laboratorium. 2. Aufl. Walter de Gruyter, Berlin (1966). — 28. KIRK, P. L., Quantitative Ultra-microanalysis, 3rd. Edition, John Wiley and Sons, New York (1959). — 29. BÜCHER, T. und M. KLINGENBERG, Angew. Chemie 70, 552 (1958). — 30. BORNER, K. und H. MATTENHEIMER, Biochim. biophysica Acta Amsterdam 34, 592 (1959). — 31. CAHN, L. und W. J. CADMAN, Analytic. Chem. 30, 1580 (1958). — 32. LINDERSTRØM-LANG, K. und K. R. MOGENSEN, C. R. Trav. Lab. Carlsberg Sér. chim. 23, 27 (1938). — 33. LOWRY, O. H., J. Histochem. Cytochem. 6, 420 (1953). — 34. LOWRY, O. H., N. R. ROBERTS und M. L. W. CHANG, J. biol. Chemistry 222, 97 (1956). — 35. POLLAK, V. E. und H. MATTENHEIMER, Arch. Int. Med. Chicago 109, 473 (1962). — 36. KAPLAN, N. O., S. P. COLOWICK und C. C. BARNES, J. biol. Chemistry 191, 461 (1951). — 37. LOWRY, O. H., N. R. ROBERTS und J. I. KAPPHAN, J. biol. Chemistry 224, 1047 (1957). — 38. LOWRY, O. H., J. V. PASSONNEAU, D. W. SCHULZ und M. R. ROCK, J. biol. Chemistry 236, 2743 (1961). — 39. BESSEY, O. A., O. H. LOWRY und M. J. BROCK, J. biol. Chemistry 164, 791 (1948). — 40. BONTING, S. L., V. E. POLLAK, R. C. MUEHRCKE und R. M. KARK, J. clin. Invest. 39, 1372 (1960). — 41. GIACOBINI, E., Science Washington 134, 1524 (1961). — 42. GIACOBINI, E., Biochem. Pharmacol. 9, 155 (1962). — 43. ROUGHTON, R. J. W. und V. H. BOOTH, Biochem. J. 40, 319 (1946). — 44. MATTENHEIMER, H. und H. DE BRUIN, Analytic. Biochem. 4, 222 (1962). — 45. BRUEL, D., H. HOLTER, K. LINDERSTRØM-LANG und K. ROZITS, C. R. Trav. Lab. Carlsberg Sér. chim. 25, 289 (1946). — 46. MATTENHEIMER, H. und K. MAX-MÖLLER, Naturwissenschaften 44, 14 (1957). — 47. MATTENHEIMER, H. und H. DE BRUIN, Enzymol. biol. clin. 4, 65 (1964). — 48. LOWRY, O. H., N. J. ROSENBROUGH, A. L. FARR und R. J. RANDALL, J. biol. Chemistry 193, 265 (1951). — 49. NAYYAR, S. N. und D. GLICK, J. Histochem. Cytochem. 2, 282 (1954). — 50. KISSANE, J. M. und E. ROBINS, J. biol. Chemistry 233, 194 (1958). — 51. DUBACH, U. C., Klin. Wschr. 41, 157 (1963). — 52. BONTING, S. L., V. E. POLLAK, R. C. MUEHRCKE und R. M. KARK, Science Washington 127, 1342 (1958). — 53. BONTING, S. L., V. E. POLLAK, R. C. MUEHRCKE und R. M. KARK, J. clin. Invest. 39, 1372 (1960). — 54. BONTING, S. L., R. C. MUEHRCKE, V. E. POLLACK und R. M. KARK, J. clin. Invest. 39, 1381 (1960). — 55. POLLAK, V. E., S. L. BONTING, R. C. MUEHRCKE und R. M. KARK, J. clin. Invest. 39, 1386 (1960). — 56. POLLAK, V. E., S. L. BONTING, R. C. MUEHRCKE und R. M. KARK, J. clin. Invest. 39, 1394 (1960). — 57. BONTING, S. L., A. D. TSOODLE, H. DE BRUIN und B. R. MAYRON, Arch. Biochem. Biophysics 91, 130 (1960). — 58. BONTING, S. L., V. E. POLLAK, R. C. MUEHRCKE und R. M. KARK, In: Biology of Pyelonephritis. S. 145. Little, Brown and Company, Boston (1960). — 59. MATTENHEIMER, H., V. E. POLLAK, R. C. MUEHRCKE und R. M. KARK, Verh. Dtsch. Ges. inn. Med. 70, 579 (1964). — 60. MATTENHEIMER, H., V. E. POLLAK, In Progress In Pyelonephritis S. 448. E. Kass. Editor. F. A. Davies Company, Philadelphia (1965). — 61. MATTENHEIMER, H., In Aktuelle Probleme der klinischen Biochemie, Vol. II. Editors H. Aebi, H. Mattenheimer und F. W. Schmidt, Hans Huber Verlag Bern (1968). — 62. THIELE, K. G. und H. MATTENHEIMER, diese Z. 4, 232 (1966). — 63. THIELE, K. G. und H. MATTENHEIMER, diese Z. 6, 132 (1968). — 64. MATTENHEIMER, H., V. E. POLLAK und R. C. MUEHRCKE, Nephron, in Vorbereitung. — 65. DUBACH, U. C., Klin. Wschr. 14, 753 (1965). — 66. DUBACH, U. C., Experientia Basel 21, 263 (1965). — 67. RECTOR, F. C., N. W. CARTER und D. W. SELDIN, J. clin. Invest. 44, 278 (1965). — 68. GOTTSCHALK, C. W., W. E. LASSITER und M. MYLLE, Amer. J. Physiol. 198, 581 (1960). — 69. POLLAK, V. E. und H. MATTENHEIMER, J. Laborat. clin. Med. S. Louis 66, 564 (1965). — 70. GUTMAN, A. B. und T. F. YÜ, Amer. J. Med. 35, 820 (1963). — 71. MATTENHEIMER, H., In: H. Aebi, H. Mattenheimer, F. W. Schmidt, Aktuelle Probleme der klinischen Biochemie Vol. I. Hans Huber Verlag, Bern (1968). — 72. MATTENHEIMER, H., Dtsch. med. Wschr. 92, 2075 (1967). — 73. DUBACH, U. C. und L. RECANT, J. clin. Invest. 39, 1364 (1960). — 74. DUBACH, U. C. und L. RECANT, Klin. Wschr. 40, 333 (1962). — 75. KISSANE, J. M., J. Histochem. Cytochem. 9, 578 (1961). — 76. KISSANE, J. M. und E. HOFF, J. Histochem. Cytochem. 10, 259 (1962). — 77. SMITH, C. H. und J. M. KISSANE, Development. Biol. 8, 151 (1963). — 78. McCANN, W. P., Amer. J. Physiol. 185, 372 (1956). — 79. MATTENHEIMER, H., V. E. POLLAK und H. DE BRUIN, Enzymol. biol. clin. 4, 107 (1964). — 80. POLLAK, V. E., H. MATTENHEIMER, H. DE BRUIN und K. J. WEIMAN, J. clin. Invest. 44, 169 (1965). — 81. BUELL, M. V., O. H. LOWRY, N. R. ROBERTS, M. L. CHANG und J. I. KAPPHAN, J. biol. Chemistry 225, 979 (1958). — 82. LOWRY, O. H., N. R. ROBERTS und C. LEWIS, J. biol. Chemistry 220, 879 (1956). — 83. LOWRY, O. H., N. R. ROBERTS, D. W. SCHULZ, J. E. CLOW und J. R. CLARK, J. biol. Chemistry 236, 2813 (1961). — 84. LOWRY, O. H. und J. V. PASSONNEAU, Biochem. Pharmacol. 9, 173 (1962). — 85. PASSONNEAU, J. V. und O. H. LOWRY, Adv. enzyme regulation 2, 265 (1964). — 86. SHANK, R. E., G. R. MORRISON, C. H. CHENG, I. E. KARL und R. SCHWARTZ, J. Histochem. Cytochem. 7, 237 (1959). — 87. MORRISON, G. R., I. E. KARL, R. SCHWARTZ und R. E. SHANK, J. Laborat. clin. Med. S. Louis 65, 248 (1965). — 88. LEE, K. D. und H. MATTENHEIMER, Enzymol. biol. clin. 4, 199 (1964). — 89. GERSON, St. J., J. MEYER und H. MATTENHEIMER, J. Investigat. Dermat. Baltimore 47, 526 (1966). — 90. BONTING, S. L. K., A.

SIMON und N. M. HAWKINS, Arch. Biochem. Biophysics 95, 416 (1961). — 91. BONTING, S. L., L. L. CARAVAGGIO und N. M. HAWKINS, Arch. Biochem. Biophysics 98, 413 (1962). — 92. BONTING, S. L. und L. L. CARAVAGGIO, Arch. Biochem. Biophysics 101, 37 (1963). — 93. BONTING, S. L., L. L. CARAVAGGIO und N. M. HAWKINS, Arch. Biochem. Biophysics 101, 47 (1963). — 94. BONTING, S. L., L. L. CARAVAGGIO, M. R. CANADY und N. M. HAWKINS, Arch. Biochem. Biophysics 106, 49 (1964). — 95.

VATES, T. S., Jr., S. L. BONTING und W. W. Oppelt, Amer. J. Physiol. 206, 1165 (1964). — 96. HERSHEY, F., C. LEWIS, J. MURPHY und T. SHIFF, J. Histochem. Cytochem. 8, 41 (1960). — 97. HOLTER, H. und K. LINDERSTRØM-LANG, Physiol. Reviews 31, 432 (1951). — 98. LINDERSTRØM-LANG, K., Selected Papers. Danish Science Press, Copenhagen and Academic Press New York und London (1962).

Prof. Dr. H. Mattenheimer
1153 West Congress Parkway
Chicago 60612, Ill., USA

Über die Mineralsubstanz der Kalkkörper von *Squalus acanthias* (Dornhai)

Zur molekularen Anatomie der Wirbelsäule, I. Mitteilung

Von M. LIEFLÄNDER, K. THOMAS, E. BOHN und H. FLACHSBART

Aus dem Max-Planck-Institut für experimentelle Medizin, Göttingen

(Eingegangen am 5. April 1968)

Herrn Professor Dr. Dr. Ernst Schütte zum 60. Geburtstag gewidmet

Knorpel- (Dornhai, Tigerhai) und Knochensubstanzen (Rind) wurden nach 3 verschiedenen Verfahren aufgeschlossen, um die anorganische Skeletsubstanz zu isolieren. Mit Papain erhielt man aus der Wirbelsäule des Dorn- und Tigerhais unversehrt die Kalkkörper, die mit chemischen und physikalischen Methoden auf ihre molekulare Zusammensetzung hin untersucht wurden. Die anorganische Skeletsubstanz der Kalkkörper der Selachierwirbelsäulen unterscheidet sich röntgenographisch und IR-spektroskopisch nicht von der anorganischen Knochensubstanz höherer Wirbeltiere. Unsere Ergebnisse deuten darauf hin, daß die anorganische Skeletsubstanz der Selachierwirbelsäule der Struktur nach einem Octacalciumphosphatcarbonat entspricht. Legt man nur die Calcium-, Phosphat- und Carbonatanalysen zugrunde, so kann man für die anorganische Skeletsubstanz der Selachier folgende Formel $\text{Ca}_4(\text{PO}_4)_2(\text{HPO}_4)_{0.6}(\text{CO}_3)_{0.4}$ vorschlagen.

Cartilage (sword fish, tiger shark) and bone (bovine) were degraded by three different methods, in order to isolate the inorganic skeletal material. Undamaged calcified structures were isolated from the vertebral column of the sword fish and tiger shark, and their molecular composition was studied by chemical and physical methods. The calcified material of the selachial vertebral column was the same as the inorganic bone substance of higher vertebrates when studied by X-ray and IR-spectrophotometry. The present results indicate that the inorganic skeletal substance of selachial vertebral column consists of octacalcium phosphate carbonate. By basing the formula only on the calcium, phosphate and carbonate analyses, the inorganic skeletal substance of the sharks may be represented by the formula $\text{Ca}_4(\text{PO}_4)_2(\text{HPO}_4)_{0.6}(\text{CO}_3)_{0.4}$.

Die Mineralisierung von Knochen und Knorpel ist ein komplizierter, bis heute noch nicht völlig durchschaubarer Prozeß (1). Obwohl ein verkalkter Knorpel seiner Struktur nach etwas anderes ist als ein Knochen, sollten doch gewisse Grundvorgänge der Mineralisierung in beiden Geweben ähnlich verlaufen.

Ein passendes Objekt für die Erforschung der Knorpelmineralisierung scheint uns, auch im Hinblick auf die biochemische Evolution des Bindegewebes, der im Atlantik lebende Dornhai *Squalus acanthias* zu sein. Sein Endoskelet besteht nahezu vollständig aus hyalinem Knorpel, wobei die Elemente der Wirbelsäule in einem direkt wahrnehmbaren Ausmaß verkalkt sind.

Im Gegensatz zu den Verkalkungen der Pflanzen und Wirbellosen überwiegt bei den Verkalkungen der Wirbeltiere Calciumphosphat eindeutig das Calciumcarbonat (2). Röntgenographische und chemisch-analytische Untersuchungen an einem umfangreichen Material führten KLEMENT (3) zu dem Ergebnis, daß es sich dabei um Apatit $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$ handeln müsse. Von Knorpelfischen wurden chemische Mineralanalysen der Zähne vom Menschenhai *Carcharias fasciatus* sowie Fluoranalysen der Knorpelplatte und Zähne

einer *Lamna*-Art angegeben; besonders viel Fluorid enthielten die Zähne von *Heptanchus cinereus*.

Die Mineralisierung des Selachierknorpels tritt besonders an den Stellen auf, wo auch eine reichliche Kollagenabscheidung stattfindet (4). Wie polarisationsoptische Untersuchungen an Brustflossenknorpel vom Hundshai *Galeus canis* ergaben, sind die Beziehungen zwischen dem Kollagen und der Calciumverbindung die gleichen wie im Knochengewebe. Die Kristallite des Calciumphosphats folgen mit ihrer negativen Achse dem Zug der Kollagenfasern (5). Im Knochen lassen sich die Kristallite ($200\text{--}4000 \text{ \AA} \cdot 15\text{--}30 \text{ \AA}$) elektronenmikroskopisch nachweisen, und man kann sie sich durch Adsorptionskräfte an die Oberfläche der Kollagenfasern gebunden denken (6).

Bisher liegen unseres Wissens chemische Analysen der Bestandteile des Selachierwirbels und Schädels — bis auf einige Mucopolysaccharidanalysen (7) — nicht vor. In dieser Arbeit berichten wir daher über Zusammensetzung und Aufbau der anorganischen Substanz der Wirbelkörper vom Dornhai. Die Kenntnis der Bausteine ist ja Voraussetzung für alle weiteren physiologisch-chemischen Untersuchungen.